

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-031762
(43)Date of publication of application : 03.02.1992

(51)Int.Cl. G01N 33/53
C07K 15/14
C12P 21/08
G01N 33/577
// C12N 5/20
C12N 15/06
(C12P 21/08
C12R 1:91)

(21)Application number : 02-139337 (71)Applicant : DAINIPPON PHARMACEUT CO LTD
(22)Date of filing : 28.05.1990 (72)Inventor : TANAKA KOSEI
NISHIMURA SHINZO
ASAYAMA KUMIKO
SUNAHARA NORIYUKI

(54) ANTI-FATTY-ACID BONDED PROTEIN ANTIBODY AND ITS APPLICATION

(57)Abstract:

PURPOSE: To recognize fatty-acid bonded protein obtained from human myocardium tissue (called hh-FABP hereinafter) by using anti-hh-FABP antibody standard material.

CONSTITUTION: A polyclonal antibody can be produced by immunizing an animal such as a mouse with hh-FABP. A monoclonal antibody can be manufactured by performing the cell fusion of the spleen cell of such immunized animal in and a myeloma cell by a Milstein's method, performing cloning, selecting a hybridoma and performing the culture of the hybridoma. As label material, enzyme such as peroxidase and B-galactosidase, radioactive substance such as ¹²⁵I and fluorescence material such as fluorescein isothiocyanate are listed. The bonding of the antibody, the label material and the like is performed by utilizing a carboxyl group, an amino group, an SH group, an OH group or the like.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑫ 公開特許公報 (A) 平4-31762

⑬ Int.Cl.⁵

G 01 N 33/53
 C 07 K 15/14
 C 12 P 21/08
 G 01 N 33/577
 // C 12 N 5/20
 15/06
 (C 12 P 21/08
 C 12 R 1:91)

識別記号

府内整理番号

D 7906-2J
 7731-4H
 8214-4B
 B 9015-2J

⑭ 公開 平成4年(1992)2月3日

7236-4B C 12 N 5/00
 8717-4B 15/00

B
C

審査請求 未請求 請求項の数 5 (全6頁)

⑮ 発明の名称

抗脂肪酸結合性蛋白抗体およびその応用

⑯ 特 願 平2-139337

⑰ 出 願 平2(1990)5月28日

⑱ 発 明 者	田 中 孝 生	大阪府茨木市南春日丘2丁目11番7号
⑲ 発 明 者	西 村 信 三	兵庫県川西市美山台3丁目1番59号
⑳ 発 明 者	朝 山 久 美 子	兵庫県神戸市倉石通1丁目2番25号
㉑ 発 明 者	砂 原 憲 之	京都府京都市西京区川島有栖川町86-2
㉒ 出 願 人	大日本製薬株式会社	大阪府大阪市中央区道修町2丁目6番8号
㉓ 代 理 人	弁理士 小島 一晃	

明細書

心筋梗塞の診断のための試薬。

1. 発明の名称

抗脂肪酸結合性蛋白抗体およびその応用

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

2. 特許請求の範囲

本発明は抗体および定量や診断に有用な試薬に関する。

(1) ヒト心筋組織由来の脂肪酸結合性蛋白(以下、*h h - FABP*といふ)を認識する抗*h h - FABP*抗体。

先行文献および解決課題

脂肪酸結合性蛋白(Fatty Acid Binding Protein、以下、*FABP*といふ)は細胞質に存在する蛋白で、脂肪酸と結合する能力を持ち、脂肪酸の細胞内代謝に関係している。*FABP*は動物の肝臓や心筋組織、小腸などに分布している。

(2) 抗体がポリクローナル抗体である請求項1記載の抗体。

最近、ヒトの心筋組織由来の*FABP*(以下、*h h - FABP*といふ)が分離精製され、その構造解析も行われている。Biochem. J., 252, 918 (1989)には、*h h - FABP*は132のアミノ酸から構成され、分子量は14768であると報告されている。

(3) 抗体がモノクローナル抗体である請求項1記載の抗体。

Circulation Res., 65, 981 (1989)にはウサギ心筋組織由来の*FABP*を用いて作成したモノクローナル抗体が*h h - FABP*と交差反応を示すことを利用して、EIA法により*h h - FABP*が定量でき

(4) ①抗*h h - FABP*抗体、②抗*h h - FABP*抗体と標識物質との結合物および③不溶性キャリヤーと抗*h h - FABP*抗体との結合または吸着物の内の少なくとも1種または2種を構成要素とする*h h - FABP*の免疫学的定量用試薬。(5) ①抗*h h - FABP*抗体、②抗*h h - FABP*抗体と標識物質との結合物および③不溶性キャリヤーと抗*h h - FABP*抗体との結合または吸着物の内の少なくとも1種または2種を構成要素とする

ると報告されている。しかし、本法は、標準物質として h h - FABPではなくウサギ心筋組織由来の FABPを用いたことおよび用いた抗体の h h - FABPに対する交差性がウサギ心筋組織由来の FABPと同等でないことがあいまって、本法での測定値は h h - FABP量を正確に反映していない。

そこで本発明者らは種々検討し、より正確な免疫学的定量法を確立するとともに多数の患者の体液中の h h - FABP量を定量したところ、h h - FABPが心筋梗塞のマーカーとして有用であることを見い出し、本発明完成した。

発明の構成

本発明は抗 h h - FABP抗体およびこれを利用した h h - FABPの免疫学的定量用試薬および心筋梗塞の診断のための試薬に関するものである。

本発明の抗体は、h h - FABPを認識し、ヒト肝臓やイヌ心筋組織由来の FABPおよびヒトミオグロビンとは実質的に交差反応をしないものである。本発明の抗体はポリクローナル抗体であってもよいしモノクローナル抗体であってもよい。より一

クトシダーゼ、アルカリホスファターゼの如き酵素、³²Iのような放射性物質、フルオレッセインイソチオシアネートのような蛍光性物質さらにはスピノ化合物などが挙げられる。不溶性キャリヤーとしては細菌細胞壁片、ガラスやポリスチレンのピース、チューブ、マイクロプレートなどのEIAやRIAで用いられるものや凝集反応用のラテックス粒子などが挙げられる。本発明の抗体と標識物等との結合は、これらが有するカルボキシル基やアミノ基、SH基、OH基などを利用して、結合剤の存在下または非存在下、常法に従って行われる。

h h - FABPの免疫学的定量は、本発明の抗体の特異的な抗原結合能力を利用する方法であればいずれでもよく、例えば、EIA法やRIA法、ラテックス凝集反応法などの方法により実施できる。

これらの免疫学的定量法で用いられる試薬としては、例えば、競合EIA法では、

- ① 抗 h h - FABP抗体
- ② ①の抗体に対する不溶化抗体（第2抗体）

層厳密な特異性を持ち均質な品質のものが継続的に安定供給できる点からすればモノクローナル抗体がより好ましい。

本発明の抗体は、通常の方法により製造できる。ポリクローナル抗体は h h - FABPでもってマウスやウサギ、ヤギ、ウマなどの動物を免疫することにより生産せしめることができるし、モノクローナル抗体はこのような免疫された動物の脾臓細胞とミエローマ細胞とをミルシュタインの方法により細胞融合させ、クローンングをなし、ハイブリドーマを選択し、これを *in vivo* または *in vitro* で培養することにより製造できる。抗原たる h h - FABPはヒト心筋組織から抽出・精製したり、細胞培養や遺伝子組換え技術により製造できる。

h h - FABPの免疫学的定量には、①本発明の抗 h h - FABP抗体、②抗 h h - FABP抗体と標識物との結合物および③不溶性キャリヤーと抗 h h - FABP抗体の結合ないしは吸着物の内の少なくとも1種または2種の試薬が用いられる。

標識物としては、ペルオキシダーゼやβ-ガラ

③ 酵素標識抗原

④ 標識酵素に対する基質

⑤ 標準 h h - FABP溶液

などが用いられ、サンドイッチEIA法では、

- ① 酵素標識抗 h h - FABP抗体
- ② 不溶化抗 h h - FABP抗体
- ③ 標識酵素に対する基質
- ④ 標準 h h - FABP溶液

などが用いられ、ラテックス凝集反応法では、

- ① ラテックス粒子と抗 h h - FABP抗体との結合または吸着物
- ② 標準 h h - FABP溶液

などが用いられる。

血清や尿の如きヒト体液中の h h - FABPレベルを検知することは心筋梗塞の診断に有用である。通常、h h - FABPレベルは心筋梗塞の直後に、まず、血清レベルがピークに達し、その1~2時間後に尿中レベルがピークになるという変動パターンをとる。尿中レベルは血清レベルよりも高く、血清レベルの50~100倍にも達することがある。

血清中の h h - FABP のピークが出現する速さ（時間）は、ヒトミオグロビンの場合と同様に速い。なお、ヒトミオグロビンは心筋梗塞の初期にそのピークが出現する点において評価されるマーカーであるが、心筋組織由来のものと骨格筋組織由来のものを区別できず、診断はかならずしも正確でないという欠点がある。ヒトの血清や尿中の h h - FABP の検知は、先に説明した免疫学定量法により行える。治療の緊急度によって、いずれの方を選択するのかを決定すればよい。例えば、手術中における心筋梗塞の発症をモニターするときはラテックス凝集反応法のような定量あるいは定性の結果がすみやかに得られる方法が好適であり、心筋梗塞が疑われる患者、例えば狭心痛を訴える患者に運動負荷を施し、h h - FABP レベルを検知するような、治療の緊急性よりも診断の正確さが求められるときは競合 EIA 法などが選択される。

具体例

次に参考例および実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明する。

緩衝液 I ; 0.05M リン酸一ホウ酸緩衝液、pH6.0

参考例 1 h h - FABP の調製

死後 5 時間後に行われた病理解剖に際して得られたヒトの心筋組織 250 g を用いて h h - FABP を以下の方法で抽出・精製した。

心筋組織をナイフで切断し、2500 ml の緩衝液 B を加え、ポリトロン型ホモゲナイザーで処理し、遠心（10万 × g、90分）し上清を得る。上清を緩衝液 B で平衡化したセファクリル S-100HR （ファルマシア社）カラム（2.5 × 95 cm）を用いて分画する。分子量 1 ~ 2 万の分画を緩衝液 C に対して十分透析後、緩衝液 C で平衡化したヒドロキシアバタイト（ナカライトスク社）カラム（2.5 × 30 cm）に添加し緩衝液 C で溶出する。最初に溶出される分画（粗製の h h - FABP）を得る。これは後記実施例 1 における免疫抗原として用いた。

粗製 h h - FABP 溶液を緩衝液 D に対して十分透析後、緩衝液 D で平衡化した DEAE - セファセル（ファルマシア社）カラム（1 × 50 cm）に添

なお、以下で略記号でもって表わされる緩衝液は次の組成からなるものである。

緩衝液 A ; 0.1 % BSA - 0.1 % NaN₃ - 0.9 % NaCl - 0.04M リン酸緩衝液、pH 7.0

緩衝液 B ; 10% グリセロール - 1 mM EDTA - 2 mM 2 - メルカプトエタノール - 0.9 % NaCl - 20 mM リン酸緩衝液、pH 7.4

緩衝液 C ; 10% グリセロール - 1 mM EDTA - 2 mM 2 - メルカプトエタノール - 20 mM リン酸緩衝液、pH 7.4

緩衝液 D ; 10% グリセロール - 1 mM EDTA - 2 mM 2 - メルカプトエタノール - 15 mM トリス - 塩酸緩衝液、pH 8.4

緩衝液 E ; 0.1 M リン酸緩衝液、pH 7.0

緩衝液 F ; 0.02M リン酸緩衝液、pH 7.0

緩衝液 G ; 1 M 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 4.0

緩衝液 H ; 0.9 % NaCl - 0.1 M リン酸緩衝液、pH 7.4

加し十分洗浄後、吸着した蛋白を塩化カリの直線的濃度勾配（0 ~ 150 mM）を有する緩衝液 C を用いて溶出する。溶出される蛋白分画を 280 nm の吸光度で追跡し、各ピークを電気泳動法により分析し、分子量が約 16000 の単一バンドを示す分画を h h - FABP 溶液とした。

実施例 1 ポリクローナル抗体の調製

参考例 1 で得た粗製 h h - FABP (2.5 mg 蛋白 / ml) に生理食塩水を蛋白濃度が 1 mg / ml となるように加え、更に等量のフロイント完全アジュバントを加えて W/O 型エマルジョンを作成し、これをウサギの足蹠 2 カ所、背部皮下 8 ケ所に 0.1 ml づつ注射する。2 週間後に背部皮下 5 カ所に 0.1 ml づつ注射する。以後同様にして追加免疫を 2 週間毎に 6 回行う。最終免疫は、粗製 h h - FABP を蛋白濃度が 2 mg / ml となるように生理食塩水で希釈した溶液を等量のフロイント完全アジュバントを加え W/O 型エマルジョンを作成し、これをウサギの背部皮下 10 ケ所に 0.1 ml づつ注射することにより行う。その 9 日後に頸動脈より

全血を採取し、血清を分離する。血清を緩衝液Aで希釈したものを抗 h h - FABPポリクローナル抗体溶液とした。

実施例 2 モノクローナル抗体の調製

実施例 1 に準じて BALB/Cマウスを免疫し、その脾臓細胞を採取する。対数増殖期にあるマウスミエローマ細胞 P3-X63-Ag8-U1 (ATCCカタログ番号 CRL-1597) の 5×10^7 個と抗体生産性脾臓細胞の 1×10^8 個を混合し、これを緩衝液Hで遠心 ($400 \times g$ 、10分) 洗浄後、37°Cに保溫した 0.5 ml のポリエチレングリコール 1500—RPMI-1640培地 (1 : 1) を徐々に加え、ゆっくり攪拌する。90秒後、37°Cに保溫した 10 ml の細胞融合用無血清培地 (500 U/ml ベニシリンG、 $50 \mu \text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン含有 RPMI-1640培地) を同様にして加え、10分後、同培地 10 ml を加えた後に遠心 ($400 \times g$ 、10分) し、上清を除去する。得られるペレットに HAT 培地を加えて、常法により培養する。抗体価の高いハイブリドーマを選択し、限界希釈法によりクローニングをなし、クローン

ml の緩衝液Fを加え、YM-5 限外疎過膜 (アミコン社) で濃縮し、さらに同緩衝液Fの 7 ml で2回洗浄濃縮を行う。濃縮液 1.5 ml に $500 \mu \text{g}$ の大腸菌由来 β -ガラクトシダーゼ (ベーリンガーマンハイム社) を含む緩衝液F 0.2 ml と飽和硫安溶液 0.2 ml の混液を滴下し、室温で80分攪拌する。緩衝液Aで十分洗浄したセファロース6B (ファマシア社) カラム ($1.5 \times 70 \text{ cm}$) に上記反応混液を流し、緩衝液Aで溶出し、 2 ml づつ分画する。25~33番目の分画をプールし、これを緩衝液Aで500倍に希釈したものを酵素標識 h h - FABP溶液とした。

実施例 5 不溶化第2抗体の調製

ラクトバチルス ブランタルム ATCC 8019の細菌細胞壁片 40 mg を水 4 ml に懸濁し、十分に均一にした後に 1 mg の抗ウサギ IgGヤギ抗体 (第2抗体) を加え、攪拌下、 $60 \mu \text{l}$ の緩衝液G、5%水溶性カルボジイミド水溶液 $120 \mu \text{l}$ および25%グルタルアルデヒド $10 \mu \text{l}$ を順次加え、室温で1時間攪拌する。反応混液を遠心 ($1500 \times g$ 、10

化ハイブリドーマを樹立する。なお、抗体価の検定は後記実施例3で調製した β -ガラクトシダーゼ標識 h h - FABPを用いて行った。クローン化ハイブリドーマを、予めブリストン処理した BALB/Cマウスに接種し、目的のモノクローナル抗体を含有する腹水を得る。

このモノクローナル抗体の性質は次のとおりである。

- ④ h h - FABPを認識する
- ⑤ ヒト肝臓由来の FABPと実質的に交差しない
- ⑥ イヌ心筋組織由来の FABPと実質的に交差しない
- ⑦ ヒトミオグロビンと実質的に交差しない
- ⑧ h h - FABPおよび酵素標識 h h - FABPの双方に対して競合的に結合する

実施例 3 酵素標識 h h - FABPの調製

参考例 1 で調製した精製 h h - FABP (3.5 mg 蛋白/ ml) 0.2 ml と 1 ml の緩衝液Eとの混液に $200 \mu \text{g}$ の m-MBS を含むジオキサン 0.2 ml を滴下し、室温で30分間攪拌する。これに 10

分) し、沈殿に 5 ml の緩衝液Aを加えて遠心洗浄する。これを3回くり返し、 0.5% の細胞壁片を含有する 20 ml の緩衝液Aに懸濁する。

実施例 5 競合 EIA 法

標準 h h - FABP溶液または検体 $50 \mu \text{l}$ を試験管にとり、これに実施例 1 で得た抗 h h - FABPポリクローナル抗体溶液 $200 \mu \text{l}$ を加えて攪拌し、室温で15~20時間放置する。これに実施例 3 で得た酵素標識 h h - FABP溶液 $200 \mu \text{l}$ を加え、37°Cで30分間放置する。次に実施例 4 で得た不溶化第2抗体の懸濁液 $200 \mu \text{l}$ を加え37°Cで30分間放置した後、 0.9% NaCl溶液 2 ml を加え遠心 ($1500 \times g$ 、10分) し、上清を除去する。この洗浄操作をさらに1回くり返す。沈殿に 0.5 ml の緩衝液Aを加えミキサーで攪拌して沈殿を完全に分散させ、37°Cで3分間予熱し、これに $100 \mu \text{l}$ の酵素基質溶液 [0.3 mM 4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトピラノシドー 1 mM MgCl_2 - 0.04 M リン酸緩衝液 (pH 7.0)] を加えて37°Cで放置する。60分後に酵素反応停止液 (0.1 M

K_2HPO_4 -NaOH緩衝液、pH 11)を加えて攪拌し、蛍光強度(励起波長365 nm、蛍光波長450 nm)を測定する。

第1図は本法における定量曲線である。

実施例 6 心筋梗塞患者の h h - FABP レベル

実施例5に従って、ある心筋梗塞患者の血中および尿中の h h - FABP レベルを定量し、第2図の結果を得た。なお、同一検体について、日本臨床化学会年会記録第26集、89頁(1986)に記載の方法に従ってミオグロビンも定量した。第2図において「s -」とあるのは血清を検体とした場合であり、「u -」とあるのは尿を検体とした場合を意味し、Mbはミオグロビンを意味する。従って例えば、「u - h h - FABP」は尿中の h h - FABP を意味する。

第2図に示すように、この患者の場合には心筋梗塞の発作が発生してから約5時間後に s - h h - FABP がピークになり、その約3時間後に u - h h - FABP のピークが出現し、そして s - h h - FABP のピークは s - Mb のピークと一致している。

像により凝集の程度を判定し、次表の結果を得た。なお、次表には同一検体について、実施例5の競合 EIA 法で定量した結果もあわせて掲載している。

第1表

検 体 (尿)	ラテックス凝集反応法 (凝集の程度)	競合 EIA 法 (ng/ml)
健常者 A	-	(検出されない)
健常者 B	-	(検出されない)
心筋梗塞患者 C	++	1058
心筋梗塞患者 D	+++	6278
心筋梗塞患者 E	+	211

前表に示すようにラテックス凝集反応法の定性結果(凝集の程度)は、競合 EIA 法の定量結果と、ほぼ対応した。本法は、緊急時における診断方法として有用であると考えられる。

4 図面の簡単な説明

第1図は競合 EIA 法による h h - FABP の定量標準曲線であり、第2図は心筋梗塞患者における血中(s-)ならびに尿中(u-)の h h - FABP

u - h h - FABP ピーク濃度は s - h h - FABP の約100倍である。

実施例 7 ラテックス凝集反応法

(1) 抗体感作ラテックス懸濁液の調製

緩衝液 I に懸濁した 10% カルボン酸変性ラテックス H0901(粒径 0.93 μm、日本合成ゴム㈱) 350 μl に 2.5 mg の水溶性カルボジイミドを含む水溶液 50 μl を滴下し、室温で攪拌する。30分後、実施例2で得たマウス腹水(抗 h h - FABP モノクローナル抗体溶液) 100 μl を滴下し室温で 30 分攪拌する。遠心後、沈殿を 5 ml の緩衝液 A で 3 回洗浄し、超音波処理によりラテックスを分散させ、緩衝液 A に懸濁し、1% の抗 h h - FABP モノクローナル抗体感作ラテックス懸濁液を調製する。

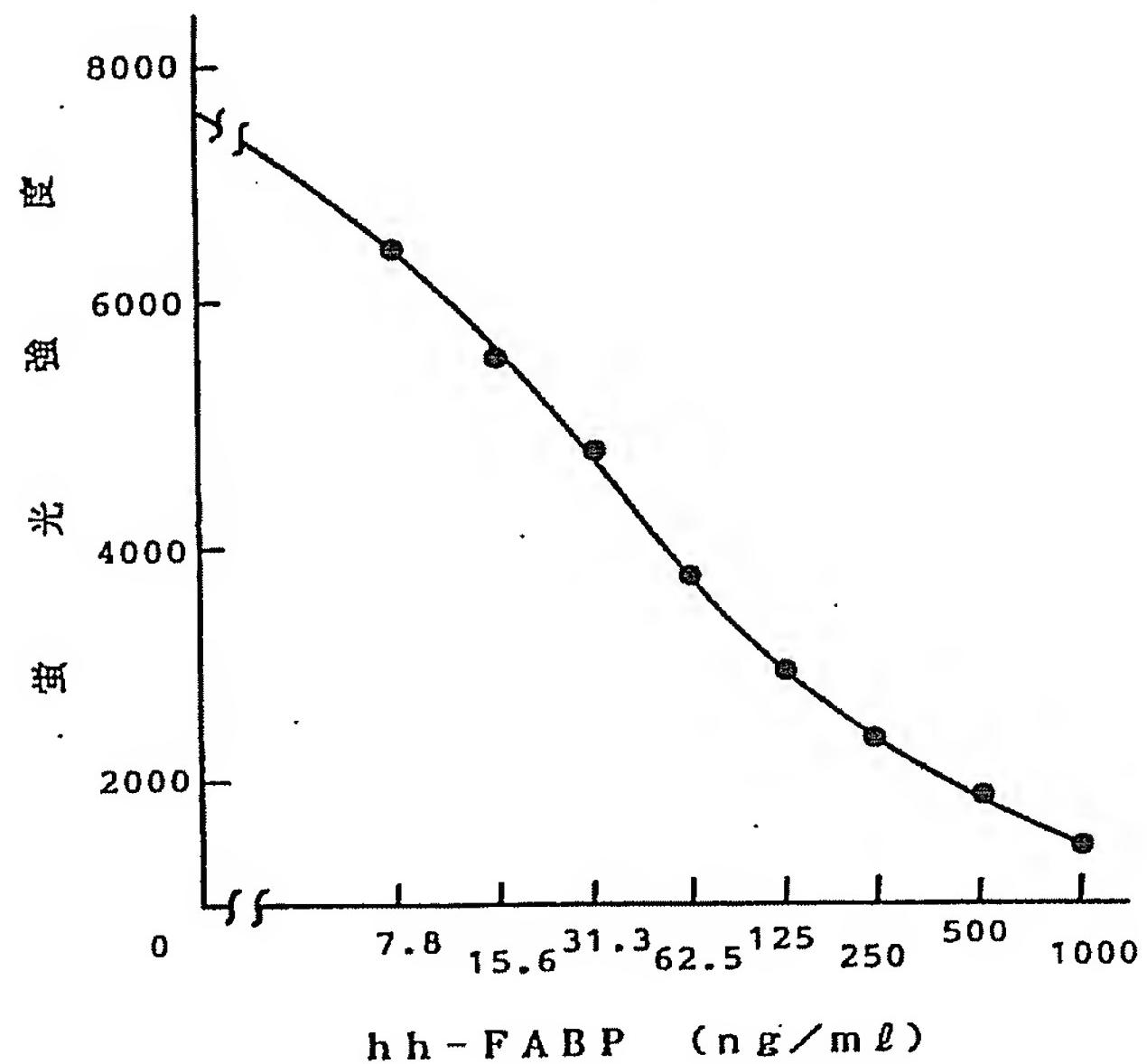
(2) 凝集反応

反応はラテックススライド法により行った。抗 h h - FABP モノクローナル抗体感作ラテックス懸濁液 20 μl を判定用スライドに滴下し、これに健常者または種々の心筋梗塞患者の尿 20 μl を加え、よく混合し、室温における 3 分後のスライド凝集

および血中ミオグロビン(s - Mb)の変動パターンを示す。

特許出願人 大日本製薬株式会社
代理人 小島一晃

第 1 図



第 2 図

